

Utilisation des marqueurs moléculaires pour l'amélioration du palmier à huile

I. – Marqueurs protéiques

Use of molecular markers for oil palm breeding

I. – Protein markers

L. BAUDOUIN⁽¹⁾

Résumé. — Dans la mesure où ils lui donnent accès à une variabilité non révélée par des moyens traditionnels, les marqueurs moléculaires constituent un outil précieux pour le sélectionneur. Leurs applications potentielles couvrent en particulier l'identification des génotypes, l'aide à l'établissement de stratégies de croisement et de sélection, en passant par l'étude de la diversité des populations. On présente ici les principaux résultats obtenus dans l'utilisation des marqueurs protéiques chez le palmier à huile. Le polymorphisme de 7 populations d'*Elaeis guineensis* utilisés en sélection a été étudié par électrophorèse enzymatique. Quinze locus polymorphes, totalisant 52 allèles ont été mis en évidence. Les populations ont pu être différenciées en fonction de leur degré de polymorphisme, lié à leur histoire en sélection, et de leur composition allélique, associée à leur origine génétique. Une relation positive a également été trouvée entre la performance des hybrides réalisés avec une de ces populations et l'éloignement génétique de son partenaire. Une étude du même type a porté sur 41 peuplements naturels d'*Elaeis oleifera* prospectés en Amazonie. Quatorze locus polymorphes portant 31 allèles ont été étudiés. La distribution du polymorphisme a permis de regrouper ces peuplements en ensembles plus vastes, liés à leur situation sur le réseau hydrographique. Appliquée à des cals cultivés *in vitro*, l'électrophorèse sur protéines totales a permis de mettre en évidence une bande spécifique des cals à croissance rapide. Ce type de cals est associé à une anomalie de floraison, observée chez certains plants issus de culture *in vitro*. Outre les applications précédentes, la diversité révélée par électrophorèse enzymatique en fait un outil efficace d'identification génétique chez le palmier.

Mots clés. — *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, électrophorèse enzymatique, diversité génétique, culture *in vitro*

INTRODUCTION

L'amélioration des plantes peut être définie comme l'art d'exploiter la variabilité existant dans une population ou une espèce afin d'obtenir des individus possédant des caractéristiques désirées. A ce titre, les marqueurs moléculaires, en mettant en évidence une variabilité non révélée par les moyens traditionnels, élargissent la gamme des outils offerts au sélectionneur. Divers types de marqueurs (terpènes, polyphénols) sont utilisables, mais ceux dont l'intérêt est le plus général sont sans doute ceux qui s'adressent au produit de la transcription du gène, les protéines, ou au gène lui-même. Après un large développement de l'électrophorèse enzymatique, sont apparues diverses techniques dirigées vers l'ADN qui ont permis d'accroître considérablement le nombre de marqueurs accessibles. Ce fut d'abord la RFLP (Restriction

Abstract. — Insofar as they provide access to variability not revealed by conventional techniques, molecular markers are a valuable tool for breeders. Their potential applications cover genotype identification, drawing up of crossing and breeding strategies and studies of population diversity in particular. This article gives the main results obtained using protein markers on oil palm. The polymorphism of seven *Elaeis guineensis* populations involved in breeding programmes was studied by enzymatic electrophoresis. Fifteen polymorphic loci totalling 52 alleles were detected. The populations were differentiated according to their degree of polymorphism, linked to their breeding background, and their allele composition, linked to their genetic origin. A positive relationship was also found between the performance of hybrids produced using one of these populations and the genetic distance between it and its partner. A similar study was carried out on 41 wild *Elaeis oleifera* stands surveyed in the Amazon basin. Fourteen polymorphic loci with 31 alleles were studied. Polymorphism distribution made it possible to group these stands in broader groups, linked to their position in the hydrographic network. Total protein electrophoresis was applied to calli cultured *in vitro*, and revealed a band specific to fast growing calli. This type of calli is linked to a flowering abnormality seen in certain plants produced by *in vitro* culturing. Besides the above applications, the diversity revealed by enzymatic electrophoresis makes it an effective tool for oil palm genetic identification.

Key words. — *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, enzymatic electrophoresis, genetic diversity, *in vitro* culturing

INTRODUCTION

Plant breeding can be defined as the art of exploiting the variability that exists within a population or species so as to obtain individuals with certain desired characteristics. By revealing variability not revealed by traditional means, molecular markers widen the range of tools available to breeders. Various types of markers (terpenes, polyphenols) can be used, but the most generally useful are undoubtedly those that work on the product of gene transcription, proteins, or the gene itself. Following extensive development of enzymatic electrophoresis, various techniques targetted towards DNA appeared, which considerably increased the number of markers available. The first was RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), followed by other

(1) CIRAD-CP - BP 5035 - 34032 Montpellier Cedex (France)

Fragment Length Polymorphism), puis sont apparues d'autres techniques telles que la PCR (Polymerase Chain Reaction) avec le RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).

Ces techniques ont été appliquées sur de nombreuses plantes. Leur utilisation chez le palmier à huile se justifie particulièrement dans la mesure où il s'agit d'une plante pérenne. En tant qu'outil d'aide à la décision pour le sélectionneur, elles doivent lui permettre de réaliser d'importantes économies de temps et de surfaces utilisées. Leurs principaux champs d'application potentiels comprennent l'étude de la diversité génétique des populations, l'appui à l'établissement de stratégies d'intercroisement et de sélection, et le contrôle de l'identité du matériel végétal. Elles constituent aussi un passage obligé pour l'utilisation du génie génétique. Le but de cet article est de présenter quelques applications des marqueurs protéiques, et de discuter des perspectives qu'elles offrent à moyen et long terme.

ETUDE DE LA VARIABILITE D'*E. GUINEENSIS* PAR ELECTROPHORESE ENZYMATIQUE

□ Matériel et méthodes

• L'électrophorèse enzymatique

Les études du polymorphisme enzymatique chez *E. guineensis* peuvent être réalisées à partir d'extraits de pollen (Ghesquiere 1983, Ataga et Fatokun 1989), ou de feuilles (Gan *et al.* 1983, Din 1985). Ces extraits s'obtiennent par broyage à basse température dans un tampon (l'adjonction de substances antioxydantes - Polyclar par exemple - est nécessaire pour les feuilles) puis centrifugation. Les extraits ainsi obtenus sont conservés par congélation.

La séparation des protéines solubles est réalisée sous l'action d'un champ électrique : les protéines migrent à une vitesse qui dépend de leur poids moléculaire et de leur charge électrique. La qualité de cette séparation est conditionnée par l'adoption de conditions de migration adéquates : le choix du gel (amidon ou acrylamide), du temps de migration et du tampon utilisé pour la migration jouent un rôle essentiel dans la qualité du résultat. L'activité enzymatique est ensuite révélée par l'adjonction de réactifs spécifiques du système étudié, qui font apparaître des bandes colorées correspondant aux différentes isoenzymes (Planche 1).

Trente-trois systèmes enzymatiques ont été étudiés (Ghesquiere 1984). Neuf d'entre eux ont été retenus pour leur aptitude à fournir des zymogrammes révélant une activité polymorphe et répétable. L'étude du déterminisme génétique a été entreprise, utilisant 23 autofécondations et un croisement contrôlé. L'examen des disjonctions obtenues a permis d'identifier 15 locus totalisant 52 allèles (Tabl. I). Parmi ces locus, deux groupes de liaison ont été mis en évidence. Dans les deux cas, un taux de recombinaison inférieur à 0,15 révèle une liaison étroite.

• Populations étudiées

Ces techniques ont permis d'étudier le polymorphisme enzymatique dans 7 origines d'*E. guineensis* (Ghesquiere 1985). Deux d'entre elles ont subi plusieurs cycles de sélection massale, qui ont probablement modifié leur structure génétique et accumulé un taux d'inbreeding notable. Il s'agit des origines Zaïre et Deli qui seront examinées séparément. A l'inverse, les autres origines (Côte-d'Ivoire, Bénin, Nigéria, Cameroun et Angola) restent plus proches du matériel non amélioré.

Un effectif total de 220 individus a été analysé. A l'intérieur de chaque origine, les prélèvements ont souvent été faits sur des individus apparentés. De ce fait, l'effectif efficace des échantillons est plus faible que le nombre réel d'individus. Il est compris entre 3,5 et 13,2 selon l'origine.

techniques, such as PCR (Polymerase Chain Reaction) with RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).

These techniques have been applied to numerous plants. Their use on oil palm is particularly warranted in that oil palm is a perennial plant. As a decision-making tool for breeders, the techniques should enable them to make considerable savings in terms of both time and the land areas used. Their main potential fields of application include a study of the genetic diversity of populations, backup for drawing up intercrossing and breeding strategies and checks on planting material identity. They are also an essential step in genetic engineering. The aim of this paper is to describe a few applications of proteic markers and discuss the medium and long-term prospects they offer.

STUDY OF *E. GUINEENSIS* VARIABILITY BY ENZYMATIC ELECTROPHORESIS

□ Material and methods

• Enzymatic electrophoresis

Studies of enzymatic polymorphism in *E. guineensis* can be carried out on pollen extracts (Ghesquiere, 1983, Ataga and Fatokun, 1989) or leaf extracts (Gan *et al.*, 1983; Din, 1985). These extracts are obtained by crushing at a low temperature in a buffer (it is necessary to add a reducing agent such as Polyclar for leaves), followed by centrifuging. The extracts obtained are preserved by freezing.

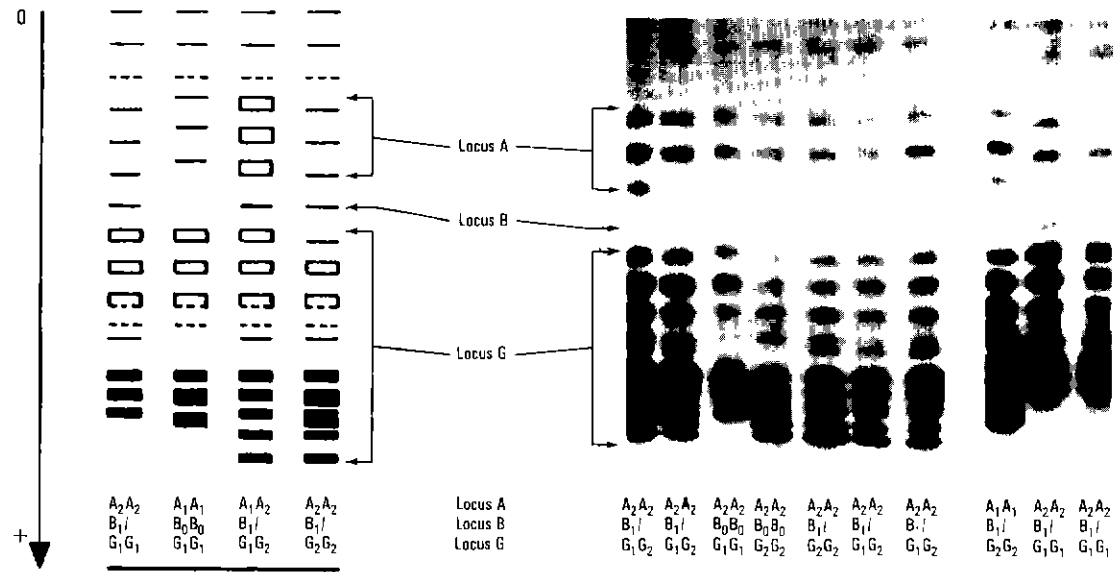
Separation of soluble proteins was carried out in an electric field: the proteins migrated at different speeds depending on their molecular weight and electric charge. Separation quality was governed by appropriate migration conditions: the choice of gel (starch or acrylamide), migration time and the buffer used for migration played an essential role in the quality of the result. Enzymatic activity was then revealed by adding reagents specific to the system studied, which produced coloured bands corresponding to the different isoenzymes (Plate 1).

Thirty-three enzymatic systems were studied (Ghesquiere, 1984). Nine were chosen for their ability to produce zymograms showing repeatable polymorphic activity. A study of genetic determinism was undertaken, using 23 selfs and a controlled cross. An examination of the disjunctions obtained led to identification of 15 loci totalling 52 alleles (Table I). Two linkage groups were detected among these loci. In both cases, a recombination rate lower than 0.15 revealed close linkage.

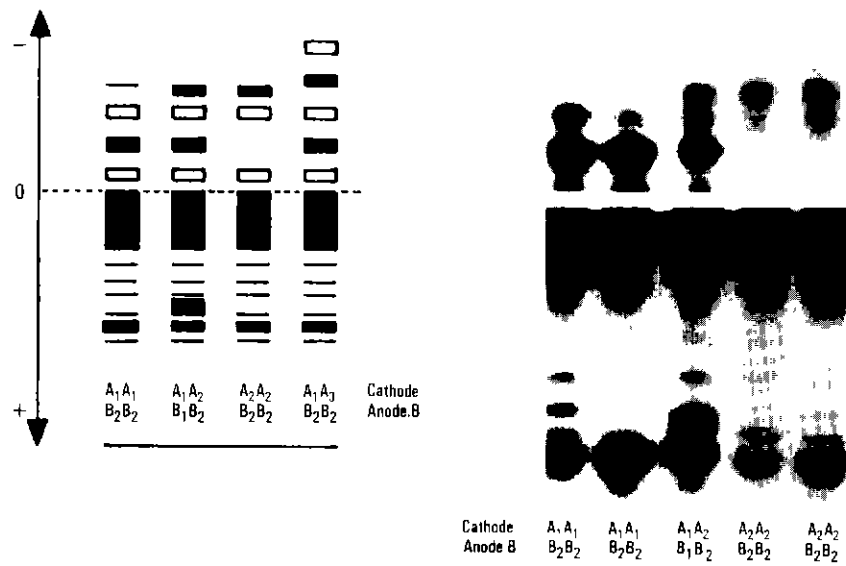
• Populations studied

These techniques were used to study enzymatic polymorphism in 7 *E. guineensis* origins (Ghesquiere, 1985). Two of them, the Zaïre and Deli origins, underwent several mass selection cycles, which probably modified their genetic structure and cumulated a substantial rate of inbreeding, and these were examined separately. On the other hand, the other origins (Ivory Coast, Benin, Nigeria, Cameroon and Angola) remained closer to the unimproved material.

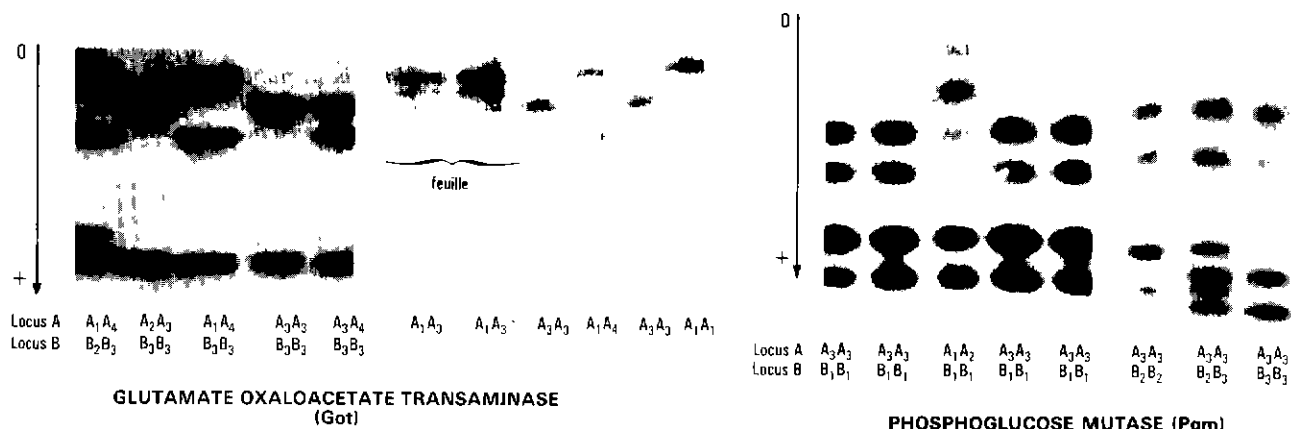
In all, 220 individuals were analyzed. Within each origin, samples were often taken from related individuals, hence the effective size of the samples was lower than the actual number of individuals, at between 3.5 and 13.2 depending on the origin.



MALATE DÉSHYDROGÉNASE (Mdh)



PHOSPHATASES ACIDES (Acp)



GLUTAMATE OXALOACETATE TRANSAMINASE (Got)

PHOSPHOGLUCOSE MUTASE (Pgm)

PLANCHE 1. — Exemples de zymogrammes obtenus à partir de pollen d'*E. guineensis* et leur interprétation génétique — (Examples of zymograms obtained from *E. guineensis* samples and their genetic interpretation) D'après Ghesquière, 1985 (From Ghesquière 1985)

TABLEAU I. — Synthèse des études de génétique formelle sur 9 systèmes enzymatiques — (*Summary of formal genetic studies on 9 enzyme systems*)

Système enzymatique (<i>Enzyme system</i>)	Abréviation (<i>Abbreviation</i>)	Locus	Nombre d'allèles (<i>Allele number</i>)	Coefficient de recombinaison (<i>Recombination value</i>)
Shikimate déshydrogénase	Skdh	A	2	(0,14 ± 0,11)
Glutamate oxaloacetate transaminase	Got	A B	4 3	
Endopeptidase	Endo	A	2	(0,05 ± 0,05)
Isocitrate déshydrogénase	Idh	A	4	
Malate déshydrogénase	Mdh	A B G	2 2 2	
Phosphatase acide	Acp	Cathodique (<i>Cathodic</i>) A Anodique (<i>Anodic</i>) A Anodique (<i>Anodic</i>) B	3 3 3	
Phosphogluconate déshydrogénase	Pgd	A	4	
Phosphoglucose isomerase	Pgi	A	4	
Phosphoglucose mutase	Pgm	A B	6 4	

Modifié d'après Ghesquière, 1984 — (*Modified from Ghesquière, 1984*)TABLEAU II. — Polymorphisme enzymatique et distribution des allèles chez 7 populations d'*E. guineensis* — (*Enzymatic polymorphism and allele distribution in 7 population of E. guineensis*)

Pays (<i>Country</i>)	Loci polymorphe (<i>Polymorphic loci</i>)	Allèles (<i>Alleles</i>)	
		Rare (fréquence <0,1) (<i>Rare frequency <0,1</i>)	Fréquence intermédiaire (0,1 < fréquence <0,6) (<i>Intermediate frequency -0,1 < frequency < 0,6</i>)
Côte-d'Ivoire (<i>Ivory Coast</i>)	9	3	7
Bénin	10	3	9
Nigeria	6	0	9
Cameroun (<i>Cameroon</i>)	9	3	11
Angola	12	2	13
Zaïre	8	0	11
Déhi	8	0	11
Total	15	22	17

Modifié d'après Ghesquière, 1984 — (*Modified from Ghesquière, 1984*)

□ Résultats

• Richesse allélique

L'analyse du polymorphisme observé dans l'ensemble de ces populations montre qu'à chaque locus correspond en général un allèle prépondérant. Le polymorphisme est alors surtout déterminé par la variabilité des allèles rares ou en fréquence intermédiaire. Il est commode de former trois groupes selon leur fréquence. On compte alors :

- 13 allèles communs (fréquence > 0,6),
- 17 allèles en fréquence intermédiaire (0,1 < fréquence < 0,6),
- 22 allèles rares (fréquence < 0,1).

L'importance du polymorphisme dans les 7 origines étudiées est résumée au tableau II. Afin de tenir compte du faible effectif efficace des populations, on n'a retenu que les allèles présents à une fréquence supérieure à 0,15 dans chaque population. Le nombre de loci polymorphes est complété par le nombre d'allèles rares ou en fréquence intermédiaire. La population Angola se révèle la plus polymorphe, principalement du fait des allèles en fréquence intermédiaire.

□ Results

• Allelic wealth

An analysis of the polymorphism observed in these populations as a whole showed that each locus generally corresponded to a dominant allele. Polymorphism was then primarily determined by the variability of alleles that were rare or of intermediate frequency. For the sake of convenience, three groups were formed based on their frequency, comprising:

- 13 common alleles (frequency 0.6),
- 17 alleles of intermediate frequency (0.1 < frequency < 0.6),
- 22 rare alleles (frequency < 0.1).

The degree of polymorphism in the 7 origins studied is summed up in table II. In order to take account of the low effective size of the populations, only alleles of a frequency greater than 0.15 in each population were used. The number of polymorphic loci was completed by the number of rare or intermediate frequency alleles. The Angola population proved

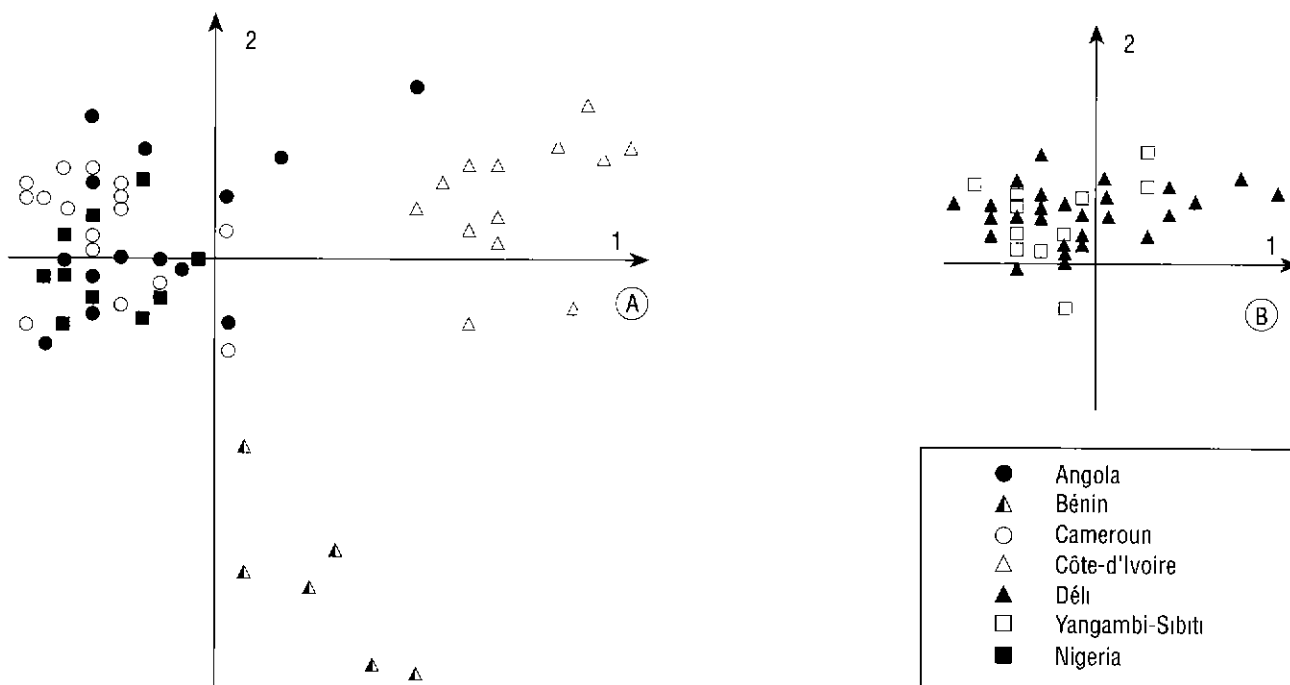


FIG. 1. — Analyse factorielle des correspondances (17 allèles en fréquence intermédiaire et 9 allèles rares) — (Factorial analysis of correspondences — 17 intermediate frequency alleles and 9 rare alleles)

A Projection des 5 origines "spontanées" — (Projection of 5 "spontaneous" origins)

B Projection des origines Déli et Zaïre en individus supplémentaires — (Projection of Deli and Zaïre origins as additional individuals)

Cameroun, Bénin et Côte-d'Ivoire viennent ensuite, tandis que le Nigéria se caractérise, tout comme les origines Zaïre et Déli par une réduction du nombre de loci polymorphes et une absence d'allèles rares en fréquence significative.

• Caractérisation des populations

Les relations entre les différentes origines ont été figurées par une analyse factorielle des correspondances (AFC), prenant en compte les allèles les plus discriminants : les 17 allèles en fréquence intermédiaire et 9 allèles rares, mais qui existent en fréquence significative dans au moins une origine (Fig. 1). Cette première analyse permet de distinguer les populations Côte-d'Ivoire (sur l'axe 1) et Bénin (sur l'axe 2) d'un groupe plus central, composé de l'Angola, du Nigéria et du Cameroun. Projetés en individus supplémentaires, le Zaïre et l'origine Déli se rapprochent du groupe précédent.

Cette analyse a été complétée en ne considérant plus que les 17 allèles en fréquence intermédiaire (Fig. 2). L'axe 1 distingue toujours l'origine Côte-d'Ivoire, alors que la population Bénin, dont l'originalité est surtout liée à quelques allèles rares revient en position intermédiaire. L'axe 2 traduit maintenant la grande variabilité de l'origine Angola. L'éclatement, par rapport à l'analyse précédente des origines Zaïre et Déli montre qu'en dépit de la perte des allèles rares, une variabilité importante a été préservée au cours du processus de sélection.

□ Recherche d'hétérosis

De nombreux indices montrent l'existence probable d'une variabilité génétique non additive importante chez le palmier à huile (Gascon *et al.* 1966, Noiret *et al.* 1966). En particulier, les croisements déli × Afrique ont une production supérieure à celle des croisements intra-origine. Cette particularité, mise à profit dans la sélection récurrente réciproque pourrait trouver son explication dans la complémentarité constatée des caractères nombre et poids moyen du régime. On peut également se demander si elle n'est pas liée à la divergence génétique entre ces origines. La bonne productivité des Déli × Afrique ne serait alors qu'un cas particulier d'un "hétérosis

to be the most polymorphic, primarily due to intermediate frequency alleles, followed by Cameroon, Benin and Ivory Coast, whereas Nigeria was characterized by a reduction in polymorphic loci and an absence of rare alleles at a significant frequency, as were the Zaïre and Deli origins

• Population characterization

The relationships between the different origins were represented by a factorial analysis of correspondences (FAC), taking the most discriminating alleles into account: the 17 intermediate frequency alleles and 9 rare alleles, but which existed at a significant frequency in at least one origin (Fig. 1). This first analysis revealed a distinction between Ivory Coast (along axis 1), Benin (along axis 2), and a more central group comprising Angola, Nigeria and Cameroon. Plotted as additional individuals, the Zaïre and Deli origins came close to the central group

This analysis was taken one step further by only considering the 17 intermediate frequency alleles (Fig. 2). The Ivory Coast origin still stood out along axis 1, whereas the Benin origin, whose originality was primarily linked to a few rare alleles, returned to the intermediate position. Axis 2 then reflected the considerable variability of the Angola origin. The scattering of the Zaïre and Deli origins compared with the previous analysis revealed that substantial variability had been retained during the selection process, despite the loss of the rare alleles.

• Search for heterosis

Numerous indications showed the probable existence of substantial non-additive genetic variability in oil palm (Gascon *et al.* 1966, Noiret *et al.* 1966). In particular, the Deli × Africa crosses produced higher yields than within-origin crosses. This aspect, made use of in reciprocal recurrent selection, could be explained by the complementarity seen between bunch number and mean bunch weight characters. It can also be wondered whether it might not be linked to genetic divergence between these origins. The high

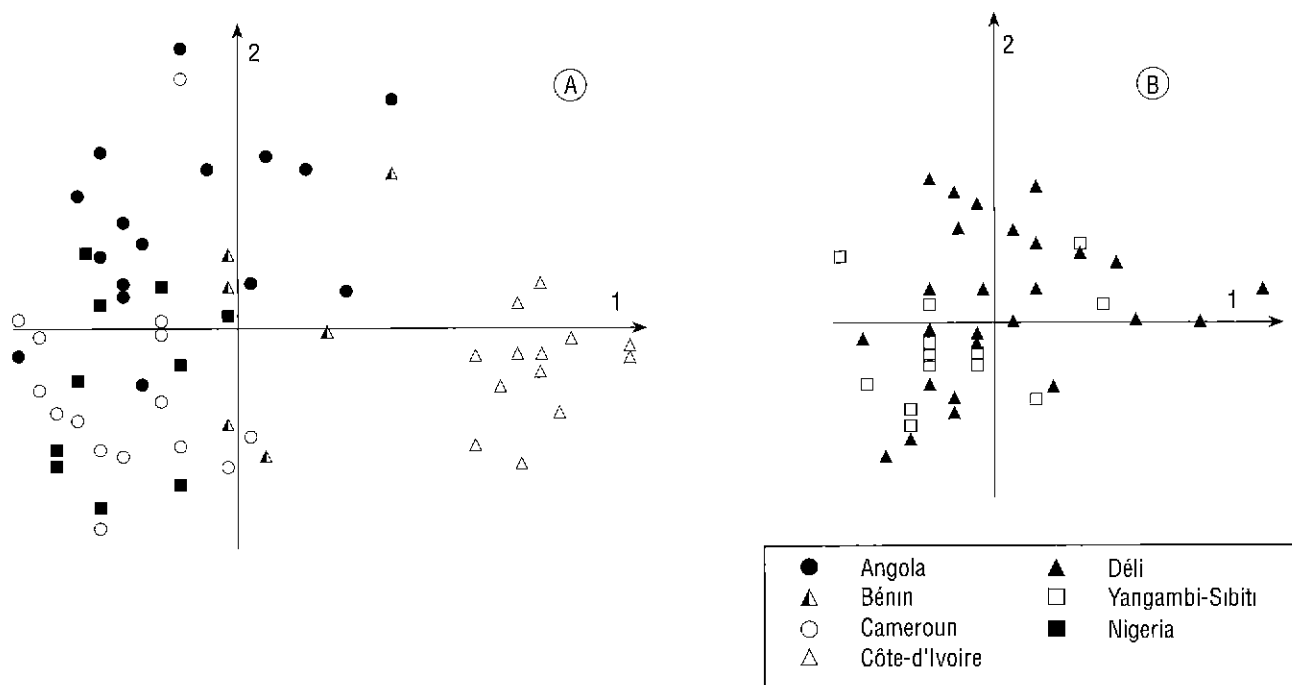


FIG. 2. — Analyse factorielle des correspondances (17 allèles en fréquence intermédiaire seulement) — (Factorial analysis of correspondences — Only 17 intermediate frequency alleles)

A Projection des 5 origines "spontanées" — (Projection of 5 "spontaneous" origins)

B Projection des origines Deli et Zaïre en individus supplémentaires — (Projection of Deli and Zaïre origins as additional individuals)

D'après Ghesquière, 1985 — (From Ghesquière, 1985)

interpopulation". Le résultat des tests d'introduction effectués sur l'origine Angola permet d'examiner cette dernière hypothèse. La figure 3 met en relation les performances moyennes des croisements intra et interorigines faisant intervenir l'origine Angola avec la distance génétique (Nei 1975) entre cette origine et son partenaire. Les résultats obtenus dans quatre écologies différentes montrent effectivement un accroissement des performances avec la distance génétique, au moins pour les plus faibles distances.

POLYMORPHISME ENZYMATIQUE CHEZ *E. OLEIFERA*

□ Méthodes d'étude et matériel végétal

Les méthodes utilisées pour l'étude d'*E. guineensis* ont été reprises pour celle d'*E. oleifera* avec quelques modifications : L'utilisation de deux nouveaux systèmes enzymatiques porte le nombre total à 11, l'emploi de feuilles au lieu de pollen permet de réaliser l'étude sur des plants de pépinière. Ces plants sont issus d'une prospection réalisée conjointement par l'EMBRAPA et l'IRHO dans le bassin amazonien (Ghesquière *et al.*, 1987). Sur les 53 populations prospectées, 46 ont donné des descendances. Elles se regroupent en 13 grands groupes géographiques (Fig. 4). Un total de 124 individus (un par descendance) est étudié.

□ Distribution géographique et polymorphisme enzymatique

L'étude électrophorétique a permis de mettre en évidence 14 locus polymorphes, totalisant 31 allèles. Chaque locus présente un allèle commun. Le polymorphisme est dû à 5 allèles rares et 12 allèles en fréquence intermédiaires. Il est intéressant de mettre en relation la distribution géographique des populations et leur représentation par une AFC fondée sur les allèles en fréquence intermédiaire (Fig. 5). Ce rapprochement permet de mettre en évidence un regroupement en relation avec le réseau hydrographique. Ce regroupement ap-

productivity of Deli \times Africa crosses would then only be a particular case of "between-population heterosis". The results of introduction tests carried out on the Angola origin can be used to examine this hypothesis. Figure 3 compares the average performance of within and between-origin crosses involving the Angola origin with the genetic distance (Nei, 1975) between this origin and its partner. The results obtained in four different ecologies indeed revealed an increase in performance in line with genetic distance, at least for the smaller distances.

ENZYMATIC POLYMORPHISM IN *E. OLEIFERA*

□ Study methods and planting material

The methods used to study *E. guineensis* were applied to *E. oleifera*, with a few modifications: two new enzymatic systems were used, bringing the total to 11, leaves were used instead of pollen hence nursery plants could be studied. These plants came from a joint EMBRAPA-IRHO survey in the Amazon Basin (Ghesquière *et al.* 1987). Out of the 53 populations surveyed, 46 produced progenies. They break down into 13 broad geographical groups (Fig. 4). A total of 124 individuals (one per progeny) were studied.

□ Geographical distribution and enzymatic polymorphism

An electrophoresis study revealed 14 polymorphic loci, totalling 31 alleles. Each locus had a common allele. Polymorphism was due to 5 rare alleles and 12 alleles of intermediate frequency. It is worthwhile comparing the geographical distribution of populations and their representation by a FAC based on the intermediate frequency alleles (Fig. 5). Such a comparison revealed grouping related to the hydrographic network. Grouping was even more

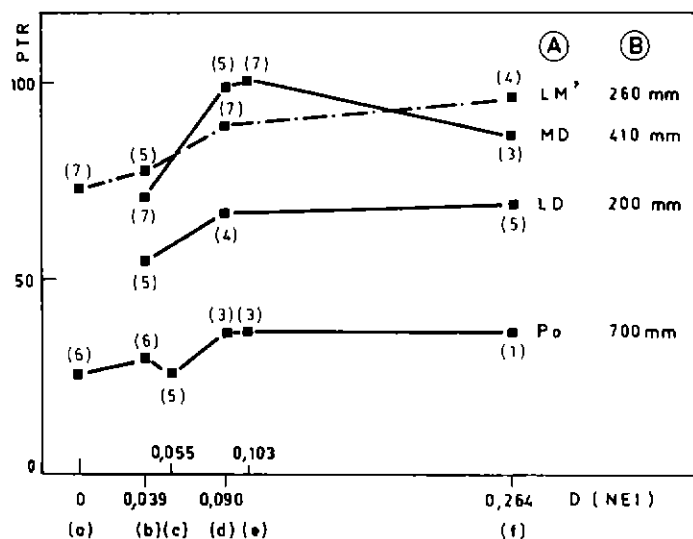


FIG. 3. — Représentation de la production moyenne des régimes en relation avec les distances génétiques (Nei) — (Plot of average ffb yield of interorigin crosses in relation with genetic distances (Nei))

— A : Stations
 LM : La Mé (Côte-d'Ivoire - Ivory Coast) - essai (trial) : LM-GP 12 (moyenne - mean)
 MD : Mondoni (Cameroun - Cameroon) - essai (trial) : MD-GP 6 (moyenne - mean)
 LD : La Dibamba (Cameroun - Cameroon) - essai (trial) : LD-GP 6 (moyenne - mean)
 Po : Akpadanou (Bénin) - essai (trial) : PO-GP 10 (moyenne - mean)

— B : DH - déficit hydrique annuel moyen (Mean annual water deficit)

— Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de croisements observés - (The figures in brackets indicate the number of crosses observed)

— (a) Angola × Angola — (b) Angola × Zaïre — (c) Angola × Nigeria
 (d) Angola × Dêl — (e) Nigeria × Dêl — (f) Angola × Côte-d'Ivoire (Ivory Coast)

D'après Ghesquière, 1985 — (From Ghesquière, 1985)

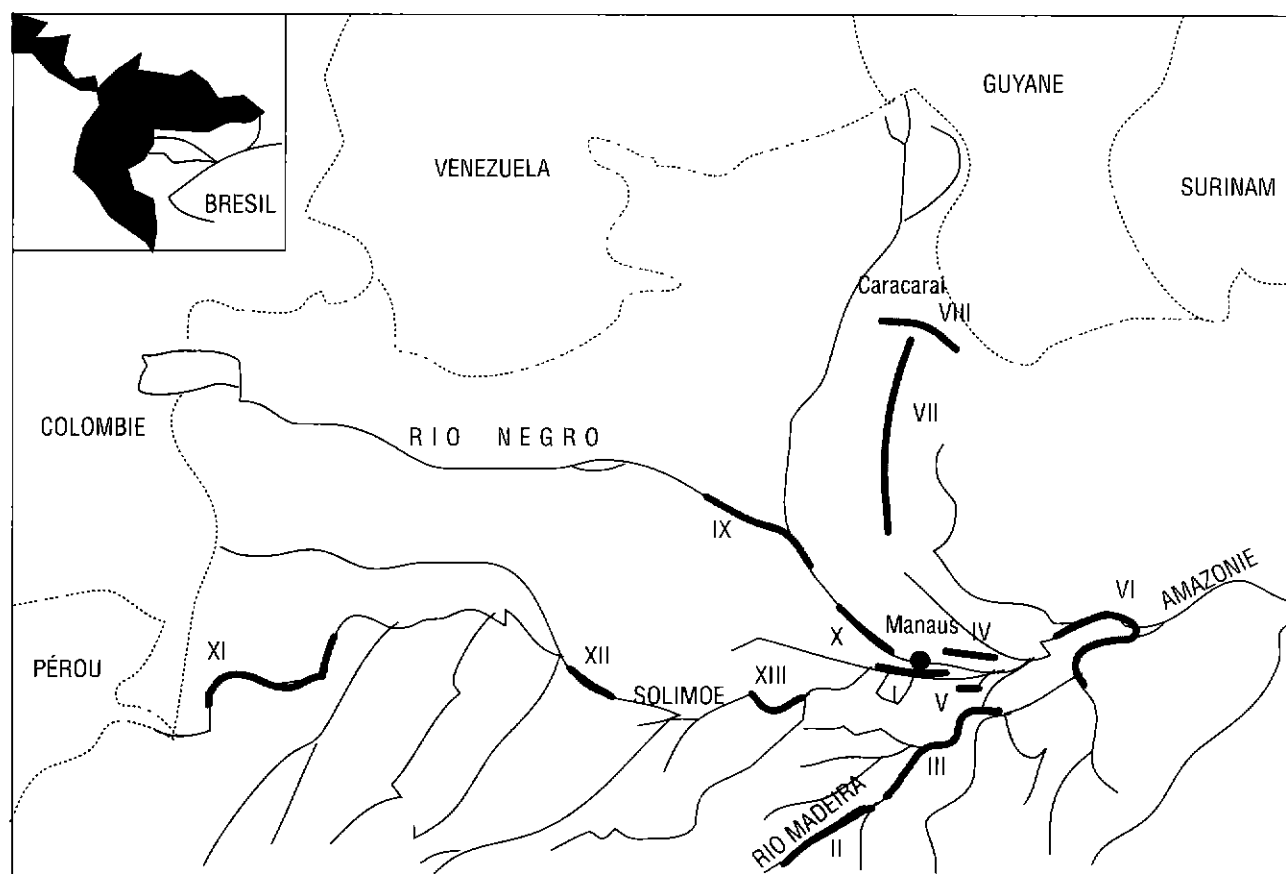


FIG. 4. — Prospection 1982 IRHO-EMBRAPA d'*Elaeis melanococca* dans le bassin amazonien — (1982 IRHO-EMBRAPA *Elaeis melanococca* prospection in the Amazon Basin)

— définition des 13 groupes géographiques — (definition of the 13 geographic groups)

— ● = situation des 46 populations analysées par électrophorèse — (location of the 46 populations analyzed using electrophoresis)

— ○ = populations non analysées — (populations not analyzed)

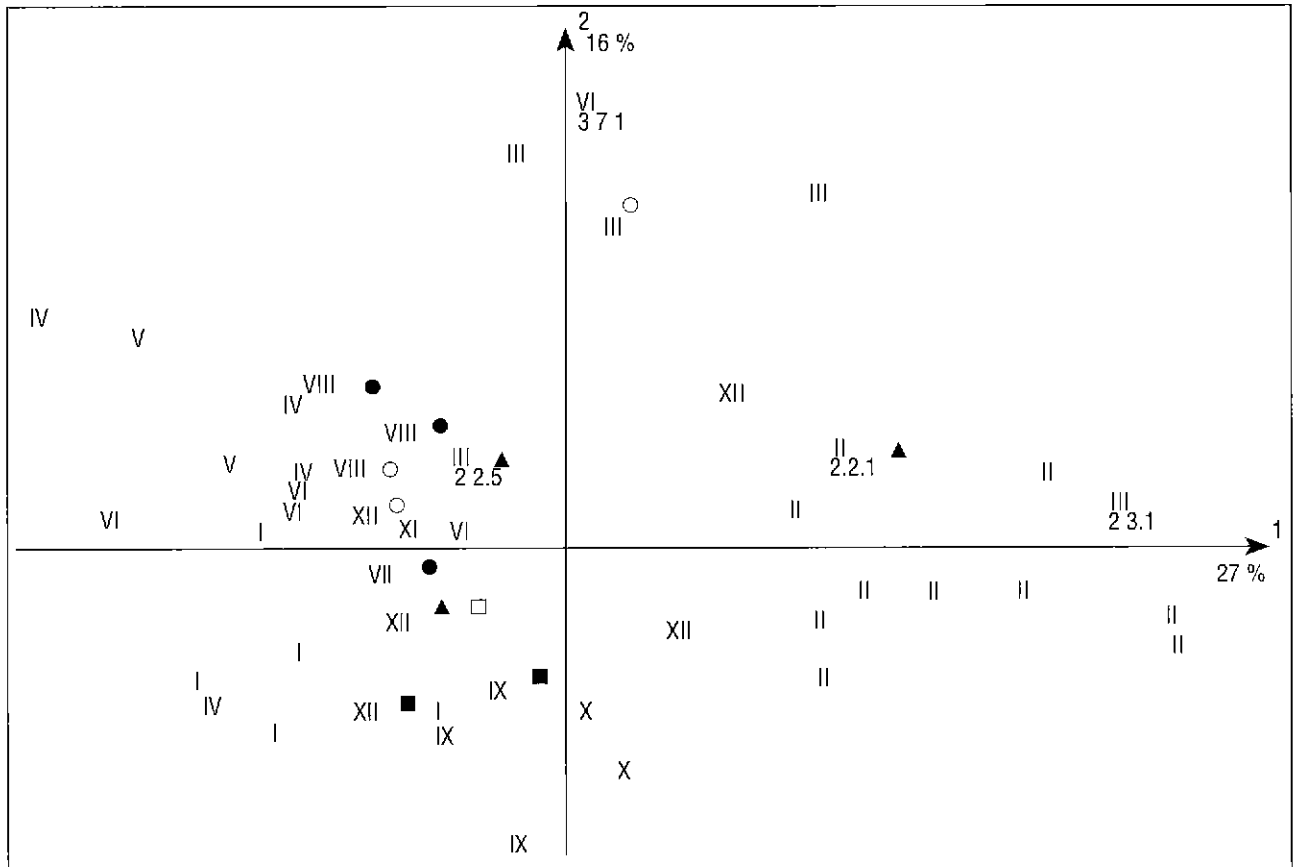


FIG. 5. — Diversité génétique des 46 populations d' *Elaeis melanococca* parmi les 13 groupes géographiques — (Genetic diversity of the 46 *Elaeis melanococca* populations from the 13 geographical groups)
 — Analyse factorielle des correspondances sur la présence de 12 allèles en fréquence intermédiaire ($0,05 < p < 0,60$) à 11 locus — (Factorial analysis of correspondences on the presence of 12 alleles of intermediate frequency $0,05 < p < 0,60$, at 11 loci)
 — Présence d'allèle rare ($p < 0,05$) dans une population — (Presence of a rare allele $p < 0,05$ in a population)
 ● = Got A2', ○ = Amy 2', ■ = Skdh 1', ▲ = Est, An A2', □ = Pgm B3'
 D'après Ghesquière *et al.*, 1987 - (From Ghesquière *et al.*, 1987)

paraît encore plus évident si l'on fait intervenir l'allèle Got A2', prépondérant dans l'ensemble VII-VIII, qui par ailleurs se rapproche nettement de l'*E. oleifera* Surinam par ses caractéristiques végétales.

MARQUEURS PROTEIQUES ET CONFORMITE DES CLONES

Les marqueurs protéiques ont également été appliqués à l'étude de la conformité des clones (Marmey *et al.*, 1991). On trouve en effet chez certains plants issus de culture *in vitro* des anomalies de la floraison entraînant une stérilité plus ou moins grave. Il existe deux types de cals à partir desquels on peut obtenir des vitroplants (Fig. 6) : les cals nodulaires et les cals à croissance rapide (CCR). Les vitroplants dérivés de ce dernier type de cals sont tous anormaux, et cette voie a été abandonnée pour cette raison. En revanche, la quasi totalité des vitroplants obtenus à partir des cals nodulaires ne présentent pas d'anomalie florale.

On a obtenu des extraits protéiques de cals nodulaires et de CCR provenant de trois arbres. A et B sont des arbres normaux issus de culture *in vitro*, C est un arbre anormal issu du même clone que A. On a réalisé sur ces extraits une électrophorèse mono-dimensionnelle dans des conditions telles que les protéines migrent en fonction de leur poids moléculaire. On constate l'apparition d'une bande correspondant à 22,2 kd pour les CCR. Cette bande n'apparaît pas pour les cals nodulaires. En revanche, une bande à 21,5 kd présente chez ces derniers voit son intensité réduite chez les CCR (Planche 2).

obvious when the Got A2' allele was involved. This allele is preponderant in the VII-VIII set, which is clearly similar to the Surinam *E. oleifera* in terms of vegetative characteristics.

PROTEIN MARKERS AND CLONE FIDELITY

Protein markers were also applied to study clone fidelity (Marney *et al.* 1991). In certain plants obtained by *in vitro* culture, certain flowering abnormalities are found, which lead to varying degrees of sterility. There are two types of calli from which ramets can be obtained (Fig. 6): nodular calli and fast growing calli (FGC). Ramets derived from the latter type of calli are all abnormal and this method has been abandoned for that very reason. On the other hand, almost all ramets obtained from nodular calli have no flowering abnormalities.

Protein extracts were obtained from nodular calli and FGC from three palms. A and B were normal palms obtained by *in vitro* culture, C was an abnormal palm obtained from the same clone as A. One-dimensional electrophoresis was carried out on these extracts under conditions such that the proteins migrated according to their molecular weight. For FGC, a band appeared corresponding to 22.2 kd. This band did not appear for nodular calli. However, the intensity of a band at 21.5 kd for nodular calli was lower for FGC (Plate 2).

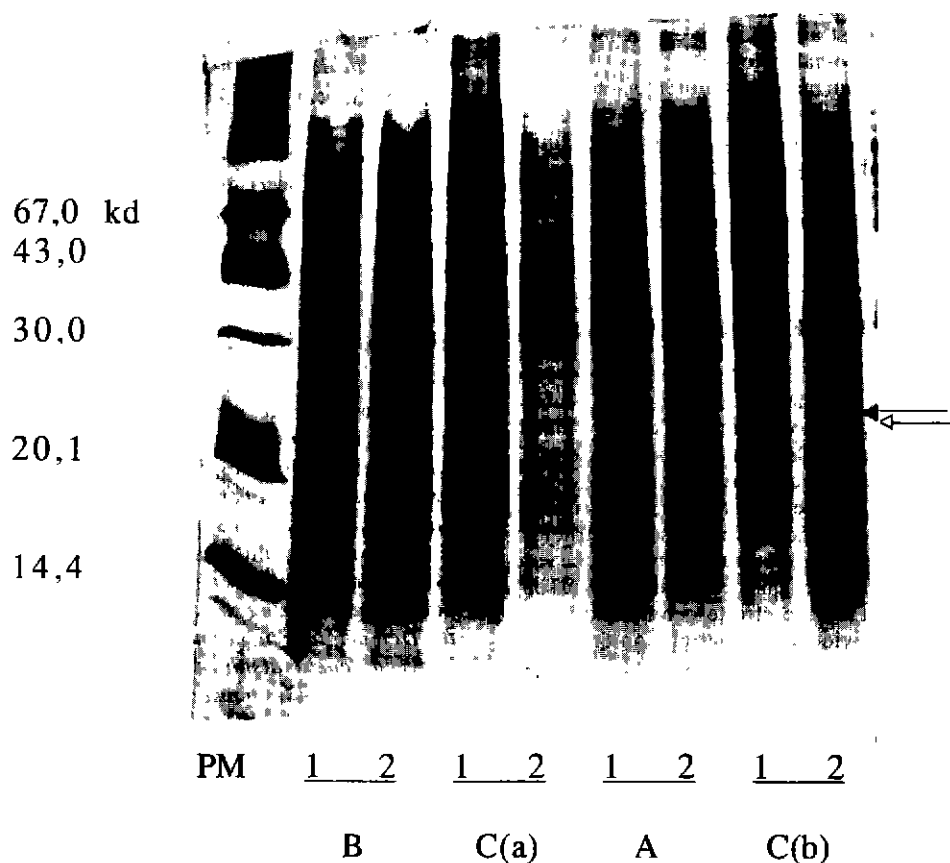


PLANCHE 2. — Profils protéiques sur gel de polyacrylamide. Comparaison des deux types de cals pour différents clones A, B et C avec une répétition de cals (a) et (b) pour le clone C. Mise en évidence d'une protéine spécifique (←) et de la diminution en intensité d'une bande (↔) chez les cals de type CCR 1 = cal nodulaire ; 2 = cal de type CCR ; PM = marqueur de masse moléculaire — (Polyacrylamide gel of proteins. Comparison of the two types of calli for different clones A, B and C with repetition of calli (a) and (b) for the clone C. Characterization of a specific protein (←) and the diminution of intensity of a band (↔) for the CCR calli. 1 = nodular callus ; 2 = CCR callus. PM = molecular weight marker) D'après Marney et al 1991 (From Marney et al 1991)

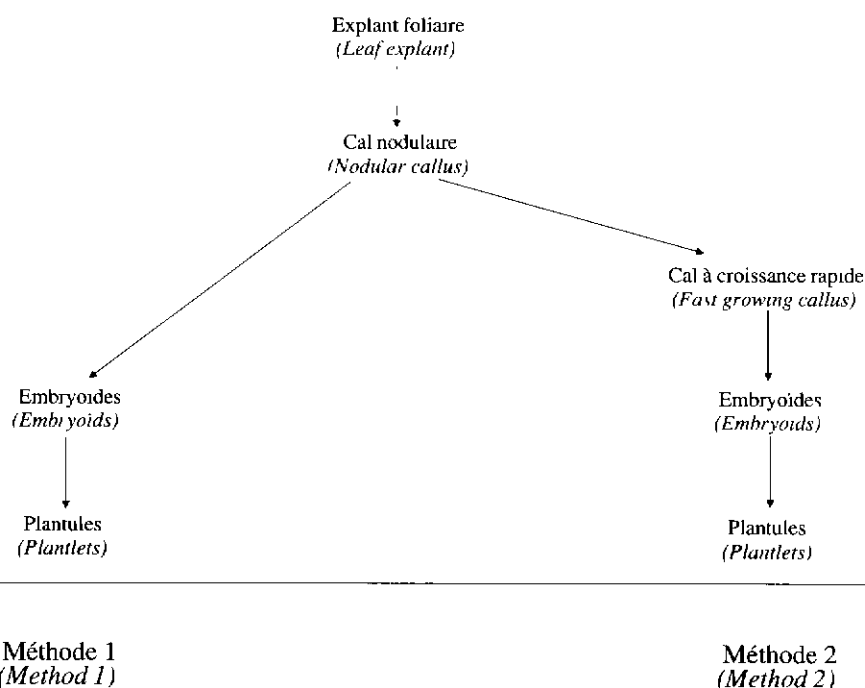


FIG. 6. — Les deux méthodes de régénération du palmier à huile par embryogénèse somatique — (The two procedures of regeneration of oil palm through somatic embryogenesis) D'après Marney et al 1991 (From Marney et al 1991)

Ce marqueur dépend du type de cal et non de la nature de l'arbre dont il provient. C'est un argument en faveur d'une origine épigénétique de l'anomalie florale.

Cette mise en évidence d'un marqueur protéique constitue un pas important dans la recherche du mécanisme de l'anomalie florale et de ses causes. On a récemment montré que ce marqueur pouvait apparaître si l'on place des cals nodulaires dans des conditions de culture favorisant l'apparition de CCR, avant que ce type de structure n'apparaisse.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les quelques exemples présentés ici illustrent différentes applications de l'étude du polymorphisme par les marqueurs protéiques pour l'amélioration du palmier à huile. L'étude du polymorphisme enzymatique a permis, en dépit d'échantillonnages un peu faibles, d'obtenir des informations utiles sur la diversité au niveau spécifique comme sur sa structuration entre les populations. On a ainsi pu montrer qu'une variabilité notable subsistait même dans des populations assez fortement sélectionnées et à base étroite comme l'origine Deli. De plus, la mise en évidence d'une relation entre distance génétique et performance des croisements interpopulations a conforté les choix faits pour l'introduction de l'origine Angola. Appliquée à des prospections comme celle réalisée en Amazonie, elle devrait permettre une exploitation plus efficace de la variabilité collectée.

L'existence d'une quinzaine de loci polymorphes et d'une cinquantaine d'allèles fait de l'électrophorèse enzymatique un outil adéquat pour le contrôle de l'identité chez le palmier. Appliquée aux protéines totales, l'électrophorèse a également permis de mettre en évidence un marqueur caractéristique du type de cal. Ce marqueur, dont la présence semble être associée à un dérèglement du métabolisme des cytokinines commun aux CCR et aux arbres anormaux, pourrait être utilisé pour prévenir l'apparition des anomalies florales et étudier son mécanisme.

This marker depends on the type of callus, not the kind of palm from which it comes. This is an argument to support the theory that floral abnormality is epigenetic.

This discovery of a protein marker is an important step in the search for the floral abnormality mechanism and its causes. It was shown recently that this marker could appear if nodular calli were placed under culture conditions favouring the appearance of FGC, before this type of structure appeared.

DISCUSSION AND PROSPECTS

The few examples given here illustrate different applications for studying polymorphism using proteic markers for oil palm breeding. Despite the somewhat limited number of samples, the study of enzymatic polymorphism provided useful information about specific diversity, and on its structuring between populations. It was thus possible to show that substantial variability persisted even in populations with a narrow base having undergone quite strong selection, like the Deli origin. Furthermore, the detection of a relationship between genetic distance and the performance of between-population crosses backed up the choices made for introduction of the Angola origin. Applied to surveys such as the one conducted in Amazonia, it should lead to more effective use of the variability collected.

The existence of around fifteen polymorphic loci and fifty or so alleles means that enzymatic electrophoresis is an effective tool for checking oil palm identity. When applied to total proteins, electrophoresis also revealed a marker characteristic of the type of callus. This marker, whose presence seems to be linked to disruption of the cytokinin metabolism common to FGCs and abnormal palms, could be used to anticipate the appearance of floral abnormalities and study its mechanism.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ATAGA C.D., FATOKUN C.A. (1989). —Disc polyacrylamide gel electrophoresis of pollen proteins in the oil palm (*Elaeis*). *Euphytica*, **40**, (1-2) 83-88.
- [2] CHEAH S.C., SITINOR AKMAR ABDULLAH, LESLIE C.-L., OOI RAHMAN A.R., MADON M. (1991). —Detection of dna variability in the oil palm using RFLP probes. Presented at *PORIM International oil palm conference*, Kuala Lumpur.
- [3] DIN A.K. (1985). —Agronomic performance and genetic variability of *Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis* hybrids (abstract). *ISOPB newsletter*, **2**, (4), 12 p.
- [4] GAN Y.Y., ABD. RAMHMAN A., TAN S.G., IDRIS ABDOL (1983). —Identification of oil palm species using electrophoresis. In *Oil palm improvement research*, SABRAO Universiti Kebangsaan Malaysia, 405-410.
- [5] GASCON J.P., NOIRET J.M., BENARD G. (1966). —Contribution à l'étude de l'hérédité de la production d'*Elaeis guineensis* Jacq. Application à la sélection du palmier à huile. *Oléagineux*, **21**, (11), 657-661.
- [6] GHESQUIERE M. (1983). —Contribution à l'étude de la variabilité génétique du palmier à huile (*Elaeis guineensis*) le polymorphisme enzymatique. Thèse de docteur-ingénieur, université Paris-Sud, 116 p.
- [7] GHESQUIERE M. (1984). —Polymorphisme enzymatique chez le palmier à huile. I. Contrôle génétique de neuf systèmes enzymatiques. *Oléagineux*, **39**, (12), 561-574.
- [8] GHESQUIERE M. (1985). —Polymorphisme enzymatique chez le palmier à huile. II. Variabilité et structure génétique de sept origines de palmiers. *Oléagineux*, **40**, (11) 529-540.
- [9] GHESQUIERE M., BARCELOS E., de M. SANTOS M., AMBLARD P. (1987). —Polymorphisme enzymatique chez *Elaeis oleifera* H.B.K. (*E. melanococca*). Analyse des populations du bassin amazonien. *Oléagineux*, **42**, (4), 143-153.
- [10] MARMEY P., BESSE I., VERDEIL J.L. (1991). —Mise en évidence d'un marqueur protéique différenciant deux types de cals issus de mêmes clones chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **313**, série III, 333-338.
- [11] MAYES S., JACK P. (1991). —The application of restriction length polymorphism (RFLPS) to oil palm (*E. guineensis*). Presented at *PORIM International oil palm conference*, Kuala Lumpur.
- [12] NEI M. (1975). —Molecular population genetics and evolution, *Elsevier*, Amsterdam, New York, 288 p.
- [13] NOIRET J.M., GASCON J.P., BENARD G. (1966). —Contribution à l'étude de l'hérédité des caractéristiques de la qualité du régime et du fruit d'*Elaeis guineensis* Jacq. Application à la sélection du palmier à huile. *Oléagineux*, **21**, (6), 343-349.

RESUMEN

Utilización de los marcadores moleculares para mejorar la palma aceitera I. —Marcadores proteínicos

L. BAUDOUIN, *Oléagineux*, 1992, 47, N° 12, p. 681-691

Los marcadores moleculares constituyen un instrumento valioso para el especialista en selección, en la medida en que le proporcionan una variabilidad que los medios tradicionales no le permiten. Sus aplicaciones potenciales abarcan entre otras cosas la identificación de los genotipos, la ayuda para establecer las estrategias de cruzamiento y mejoramiento, como también el estudio de la diversidad de las poblaciones. Aquí se refieren los principales resultados logrados en la utilización de los marcadores proteínicos en la palma aceitera. El polimorfismo de 7 poblaciones de *Elaeis guineensis* utilizadas para el mejoramiento se estudió por electroforesis enzimática. Se evidenciaron 15 locus polimorfos, que representan un total de 52 alelos. Las poblaciones han logrado diferenciarse según el grado de polimorfismo, relacionado con la historia en el mejoramiento y con su composición de alelos, asociada con su origen genético. También se encontró una relación positiva entre los resultados de los híbridos obtenidos con una de estas poblaciones y la distancia genética de su pareja. Un estudio del mismo tipo abarcó 41 poblamientos silvestres de *Elaeis oleifera* prospectados en Amazonia. Se estudiaron 14 locus polimorfos que llevaban 31 alelos. La distribución del polimorfismo permitió que estos poblamientos se agruparan dentro de conjuntos más amplios, relacionados con su ubicación en la red hidrográfica. La electroforesis en proteínas totales aplicada a callos cultivados *in vitro* permitió evidenciar una banda específica de los callos de crecimiento rápido. Este tipo de callos se halla asociado con una anomalía de la floración observada en algunos plantones obtenidos por cultivo *in vitro*. Además de las aplicaciones anteriores, la diversidad evidenciada por electroforesis enzimática resulta un instrumento eficaz de identificación genética en la palma.

Palabras claves. — *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, electroforesis enzimática, diversidad genética, cultivo *in vitro*.